



(19) SU (11) 1490961 (13) A1
(51) 5 С 12 N 15/52

СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР (ГОСПАТЕНТ СССР)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к авторскому свидетельству

(21) 4262311/13

(22) 170687

(31) 22739

(32) 14.10.86

(33) НИ

(46) 150794 Бол № 13

(71) Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Венекс Контрактор Лтд (НИ)

(72) Фодор И.И., Мельников А.А., Янош Моннар(НИ); Петер Хорват(НИ)

(56) Kotewicz et al Gene, 35, 249, 1985.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА

(57) Изобретение относится к генетической инженерии. Согласно предлагаемому способу ко-

2

дирующий обратную транскриптазу ро-ген ДНК вируса саркомы Рауса встраивают в плазмидный вектор экспрессии, в частности в pUC 9, непосредственно за lac-промотором, полученные фрагменты используют для трансформации бактерий *Ecoli*, после чего отбирают рекомбинантную ДНК обладающую набором последовательностей, обеспечивающих репрессию и индуцию вирусного ро-гена связывание его МРНК с рибосомой, а также последовательностью инициации и терминации трансляции. Полученной рекомбинантной ДНК трансформируют *Ecoli* клетки бактерий разрушают и фермент очищаютmonoобменной хроматографией.

SU

1490961

A1

Изобретение относится к биотехнологии и молекулярной биологии, а именно к способу получения фермента - обратной транскриптазы видуса саркомы Рауса (RSV). Способ заключается в том, что кодирующий сегмент ратную транскриптазу роl-ген выделенный из ДНК вируса саркомы Рауса, встраивают с помощью лигазы в плазмиду с большим числом копий таким образом, чтобы указанный ген находился в плазмиде непосредственно за lac-промотором, который может быть репрессирован и легко индуцирован. Полученной лигазной смесью затем трансформируют E.coli, после чего отбирают трансформированные клетки, несущие ДНК с набором последовательностей, обеспечивающих подавление и экспрессию вирусного роl-гена, связывание его МРНК с рибосомой, а также с последовательностями, обеспечивающими инициацию и терминацию трансляции. Рекомбинантной плазмидой трансформируют E.coli, бактериальные клетки после индукции разрушают и извлеченный сырой фермент - обратную транскриптазу подвергают очистке.

Пример 1. Получение плазмидной ДНК.

6 мкг ДНК плазмиды pSRA-2 подвергают последовательно обработке рестриктазами XbaI, XhoI и PstI. Проверку эффективности расщепления электрофорезом в агарозном геле производят после каждого гидролиза.

Также выполняют гидролиз ферментами PstI и Sall 2 мкл ДНК pUC 9.

Обе ДНК подвергают осаждению 96%-ным этанолом и трехкратной промывке 70%-ным этанолом. Каждую из двух осажденных фракций растворяют в 20 мкл лигирующего буфера.

Смесь, приготовленную из 280 нг расщепленной ДНК pUC 9 и 1350 нг расщепленной ДНК pSRA-2, дополняют необходимыми компонентами и после добавления 10 единиц лигазы оставляют на ночь в холодильнике при 8°C.

С помощью лигазной смеси (5-10 мкл) проводят трансформацию клеток штамма бактерий E. coli HB 101, предварительно обработанных CaCl₂. Клетки растирают на агарных пластинках, приготовленных с питательной средой LB и дополненных 0,5% глюкозы и 20 мкл/мл ампциллина. После инкубации в течение 18 ч при 37°C проводят анализ выращенных колоний, пределяют размер содержащейся в них плазмиды.

Отбирают штаммы, содержащие исключительную плазмиду размером в 5,5 кв. (pMF 14). Эти клетки выращивают в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу и ампцил-

лин, затем производят выделение плазмиды. Плазмиду проверяют с помощью рестриктаз (PstI, Sall, BamHI, HindIII), а также их сочетаний и сопоставляют с оригинальной картой роl-гена.

Отобранный клон далее используют для тестирования фермента, поступая при этом следующим образом.

2 мл культуры, выращенной за ночь на питательной среде LB с глюкозой и ампциллином, используют для посева в 20 мл указанной среды, и проводят инкубацию при энергичном встряхивании при 37°C. При достижении плотности E₆₅₀ 1,0 к культуре добавляют свежеприготовленный водный раствор IPTG, доводя концентрацию последнего до 1 мМ, и продолжают инкубацию еще в течение 60 мин.

Собранные центрифугированием клетки обрабатывают лизоцимом и лизирующим раствором.

Лизирующий раствор:

1% Triton X-100
0,2% NP-40
1 mM EDTA (этилендиаминететрацетат)
2 mM DTT (дитиотреитол)
2 mM PMSF

10 mM фосфата натрия (pH 8,0)

Разрушают сферопласти. Прозрачную фракцию, полученную в количестве 200-400 мкл, непосредственно используют для тестирования ферментативной активности.

Проверенный, продуцирующий обратную транскриптазу клон выращивают и индуцируют синтез белка, продукт из культуры выделяют с целью характеристики фермента.

Пример 2. Препартивное выделение обратной транскриптазы.

800 мл культуры E. coli HB 101, содержащей плазмиду pMF 14, выращивают на питательной среде LB с добавленной глюкозой (0,5%) и ампциллином (100 мкг/мл) до достижения плотности 2,2.

После центрифугирования клетки сусpendingируют в 50 мл питательной среды M9, не содержащей глюкозы, но содержащей ампциллин. После инкубации с энергичным встряхиванием в течение 30 мин добавляют IPTG до достижения концентрации 10 мМ, затем продолжают инкубацию еще в течение 90 мин. Собранные центрифугированием хлелки замораживают жидким азотом и обработки хранят при -20°C.

Все операции по выделению фермента проводят при 4°C.

Замороженные клетки сусpendingируют в 8 мл 10%-ного раствора сахарозы, содержащего 1 mM фосфата натрия (pH 8,0), и к суспензии добавляют 2 мл раствора лизоци-

ма в этом же фосфатном буфере с концентрацией 20 мг/мл. Спустя 10 мин ненасыпают 11 мл лизирующего раствора и два слоя осторожно перемешивают. Полученный раствор подвергают центрифугированию при 100000 г в течение 1 ч, затем к верхнему слою добавляют пятимолярный раствор NaCl до достижения конечной концентрации 0,1 М (в данном примере для этого к 43,5 мл верхнего слоя следует добавить 870 мкл 5 М раствора NaCl) и этот раствор наносят на колонку с DE 32 размерами 2x12 см, уравновешенную буфером А (10% глицерина, 5% сахарозы, 0,2% Triton-40, 10 мМ фосфата натрия, pH 8,0, 1 мМ DTT, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ PMSF, 0,1 м NaCl).

Бета-субъединица обратной транскриптазы не сорбируется на носителе, в то время как значительная часть ДНК-полимеразы, а также нуклеиновые кислоты, мешающие последующим хроматографическим разделениям, оказываются сорбированными.

Колонку промывают буфером А до тех пор, пока несорбируемое вещество полностью смыывается (экстинкция элюата А₂₃₀ 0,1), и пропущенный раствор (140 мл) подвергают диализу трижды по 4 ч против 1 л буфера Б.

Бүфсөр б.

- 10% глицерина
 0.2% NP-40 (ионидет Р-40)
 10 mM фосфата натрия (рН 8.0)
 1 mM DTT
 0.5 mM EDTA
 0.1 mM PMSF

Полученный после диализа продукт износят на колонку с фосфоцеллюлозой Р11 размерами 2x20 см. Колонку промывают буфером Б до снижения экстинкции до $A_{280} 0.1$ (в данном примере на это потребуется 200 мл буфера), затем через колонку пропускают градиент буфера Б в режиме 0,01-1,0 М, собирая фракции объемом 4 мл.

Из каждой фракции отбирают пробу объемом 3 мкл для определения активности обратной транскриптазы. Активные фракции, элюированные в интервале 0,25–0,33 М, собирают и объединенный злюат подвергают дialизу в течение 3х8 ч против 3х2 л буфера В.

Буфер В:

- 10% глицерина
0.2% NP-40
1 mM DTT
0.5 mM EDTA
10 mM фосфата калия (рН 8.0)

После диализа вещество наносят на колонку с DE 32 размерами 1x5 см, несorbируемые вещества смывают буфером В.

Обратную транскриптазу затем элюируют буфером В, содержащим 0,5 М KCl, собирают фракции объемом 0,4 мл. Активность обратной транскриптазы во фракциях определяют, титрая из них пробу объемом 1 мкл.

Съединенные активные фракции (около 3 мл) подвергают дialisу в течение 18 ч против буфера Г.

10 Буфер Г:

- 50% глицерина
50 mM фосфата калия (рН 8.0)
50 mM KCl
1 mM DTT
0.5 mM EDTA

В результате описанных процедур очистки получается 1 мл раствора обратной транскриптазы, обладающего активностью 20 ед./мкл.

Суммарное количество фермента, вырабатываемого из 800 мл исходной бактериальной культуры, составляет таким образом около 20000 ед.

25

5 Пример 3. Препарат в состоянии поддерживать синтез ДНК в стандартной реакционной смеси в течение не менее 2 ч. Денатурирующий гельэлектрофорез РНК не показывает изменений при инкубации РНК с препаратом, полученным согласно предлагаемому способу, в течение 4 ч. Это доказывает, что очищенная рекомбинантная обратная транскриптаза не содержит специфических нуклеаз.

35

Рекомбинантная обратная транскриптаза синтезирует поли dT в системе засева - матрица rA/dT_{45} , как в присутствии ионов Mg^{++} , так и в присутствии ионов Mn^{++} .

40

Оптимальная концентрация этих ионов составляет 3 и 2 мМ соответственно. Наличие этих ионов в концентрации 6 мМ приводит к незначительному снижению скорости реакции.

45

Фермент выполняет свои функции также в системе затравка - матрица полигСт/олиго³⁵, но лишь в присутствии Mn⁺⁺. Активность фермента на этом субстрате составляет около 25% от активности, измеряемой на классическом субстрате полигА/дТ

55

В системе поли А⁺ мРНК/олиго дТ (т.е. при синтезе кДНК) оптимальная для фермента концентрации Mg⁺⁺ составляет 6 мМ, тогда как концентрация Mn⁺⁺ составляет 2 мМ, 7,5 ед.акт. фермента включают [3H]-dTTP в количестве, соответствующем образованию 0,8-1,6 нмоль кДНК. Размер получаемого продукта составляет 200-1600

нуклеотидов в случае поли А⁺ мРНК дрозо-
филлы и 400–7000 нуклеогидов в случае зна-

чительно более длинной гетерогенной ядер-
ной поли А⁺ РНК печени крысы.

Формула изобретения

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА, заключающийся в том, что в плазмиду pUC9 непосредственно за lac-промотором с помощью лигазы встраивают Pst-XbaI-фрагменты плазмиды pSRA-2, полученной смесью ДНК трансформируют клетки E.coli, после чего по устойчивости к антибиотику отбирают трансформированные клетки, из которых выделяют ДНК, за-

5 тем из них по молекулярной массе отбирают ДНК, которая содержит набор последовательностей, обеспечивают репрессию и экспрессию вирусного pol-гена и связывание его мРНК с рибосомой, а также последовательности, инициирующие и терминирующие трансляцию, затем выделенной рекомбинантной ДНК трансформируют клетки E.coli HB 101, после культивирования бактериальные клетки разрушают и выделяют обратную транскриптазу монобменной хроматографией

Редактор Л. Павлов

Составитель А. Спундэ
Техред М. Моргентал

Корректор О. Кравцова

Заказ 441

Тираж
НПО "Поиск" Роспатента
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Подписьное